

## 明細書

## パクリタキセル療法による副作用を予測する方法およびキット

## 技術分野

- 5      本発明は、遺伝子多型を同定することにより、パクリタキセル療法の副作用の一つである顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法、ならびにかかる方法を実施するための診断用キットに関する。

## 背景技術

- 10      パクリタキセルは、タキソール（登録商標）などの名称でも知られるジテルペン誘導体のアルカロイドである。微小管蛋白重合を促進することにより微小管の安定化・過剰形成を引き起こし、紡錘体の機能を障害することにより細胞分裂を阻害する抗腫瘍剤であり(Manfredi, J. J. and Horwitz, S. B. Taxol: an  
antimitotic agent with a new mechanism of action. Pharmac. Ther., 25: 83-  
15      125, 1984)、乳癌、卵巣癌、胃癌および非小細胞肺癌等の種々の癌の治療に広く用いられている。パクリタキセル療法の最適投与量および投与スケジュールについては、現在も種々の臨床試験が進行中である。パクリタキセル療法による副作用の主要なものの1つは顆粒球減少症であり、この副作用の発症のために投与量が制限されている(例えば、Seidman, A. D., et al. Dose-dense therapy with  
20      weekly 1-hour paclitaxel infusions in the treatment of metastatic breast cancer. J Clin Oncol, 16: 3353-3361, 1998)。

- パクリタキセル療法による副作用を低下させる方法として、患者の遺伝子を分析することにより副作用を予測し、その薬剤の使用または投与量を決定する方法が研究されている。このような研究から、薬剤代謝に関連するか、あるいは薬剤  
25      活性と機能的に関連している遺伝子が、薬剤の副作用の発症の原因である可能性が明らかになった。例えば、チトクロームP 4 5 0ファミリー等の薬剤代謝関連遺伝子におけるいくつかのc S N P s が、高い頻度でいくつかの薬剤の副作用と相関していることが示されている(Relling, M. V. and Dervieux, T.  
Pharmacogenetics and cancer therapy. Nat Rev Cancer, 1: 99-108, 2001)。し

かし、これらの高リスク遺伝子多型のアレル頻度は比較的低いため、大部分の患者について副作用を生ずる可能性を説明するには不十分である。したがって、パクリタキセル療法による副作用の発症と遺伝子多型との相関に関するさらなる研究が必要とされている。

- 5 特開 2003-93068 は、代謝酵素 CYP2C8 の多型を調べることにより、患者のパクリタキセルに対する感受性を予測する方法を開示する。しかし、この出願に開示されるアミノ酸変異を伴う遺伝子変異はいずれもアレル頻度が低い。例えば、この出願の発明者らは、これらのアレル頻度が  $<0.007$  であると報告している (Soyama, A., Y. Saito, et al. (2001). "Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism." Biol Pharm Bull 24(12), 1427-1430)。
- 10

本発明の目的は、パクリタキセル療法における顆粒球減少症の発症の可能性を予測するための方法ならびにキットを提供することである。

## 15 発明の開示

- 本発明は、被験者から単離された遺伝子について、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 11 番目の塩基における
- 20 遺伝子多型、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 5 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b 遺伝子
- 25 中の配列番号 8 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型、および BUB1b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 11 番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選択される 1 またはそれ以上の遺伝子多型を同定する工程を含む、被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症

の発症のリスクを予測する方法を提供する。これらの配列は以下の表 1 に示される。

表 1

JSNP ID	配列	配列番号
IMS-JST111898	CAGAGCAAGGRCAACTGTTTC	1
IMS-JST105874	TACTTTTACCYTAAATATGAG	2
IMS-JST082397	GAGATCAGTARAAACAGTATG	3
IMS-JST071852	GAAATTTCCAWAGTGCTGGTT	4
IMS-JST071853	ATTGCTATTTTRTCCATGATCA	5
IMS-JST074538	GGAGTCGTGTRCGTGCCTTGG	6
IMS-JST079837	GACTGACACAKAATTATTATT	7
IMS-JST044164	AACTGGCTGTYGTGCAGTCTC	8
IMS-JST063023	AGGAAGGCAAYCTGTTTTTTT	9
IMS-JST042569	GGGTACATCTYAGCTATGCCA	10

5 R=A/G; Y=T/C; W=T/A; K=T/G

本発明の 1 つの態様においては、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 11 番目の塩基におけるジェノタイプが G/G であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、A/G または A/A であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

10 本発明の別の態様においては、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 11 番目の塩基におけるジェノタイプが T/T であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、C/T または C/C であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

15 本発明の別の態様においては、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 11 番目の塩基におけるジェノタイプが G/G であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、A/G または A/A であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

20 本発明の別の態様においては、CYP2C8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 11 番目の塩基におけるジェノタイプが T/T であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、A/T または A/A であるときに、顆粒

球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

本発明の別の態様においては、CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがG/Gであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、A/GまたはA/Aであるときに、顆粒

5 球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

本発明の別の態様においては、BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/Aであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、A/GまたはG/Gであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

10 本発明の別の態様においては、BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、G/TまたはG/Gであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

本発明の別の態様においては、BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される  
15 配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがC/Cであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、C/TまたはT/Tであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

本発明の別の態様においては、BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがC/Cであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、C/TまたはT/Tであるときに、顆粒球  
20 減少症の発症のリスクが低いと予測される。

本発明の別の態様においては、BUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測され、C/TまたはC/Cであるときに、顆粒  
25 球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

さらに本発明においては、本発明により同定されたSNPsの1またはそれ以上を任意に組み合わせて、顆粒球減少症の発症のリスクをより高い精度で予測することができる。後述の実施例に示されるように、特定のSNPsの組み合わせと顆粒球減少症の発症率との相関が特に高いことが見いだされた。すなわち、本

発明は、被験者から単離された遺伝子について、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基およびBUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することを含む、被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法を提供する。

好ましくは、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tであり、かつBUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/AまたはG/Gであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測される。また好ましくは、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/TまたはA/Aであり、かつBUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/Gであるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測される。

さらに別の観点においては、本発明は、被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測するための診断用キットを提供する。該キットは、被験者から単離された遺伝子について、CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、およびBUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子多型を同定するための試薬を含有することを特徴とする。

本発明のキットに含有される試薬は、好ましくは以下の核酸分子から選択される1またはそれ以上の核酸分子である：

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 5 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 8 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 1 0 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 11 番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも 10 個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子。

- ここで、核酸分子が塩基を「含む」とは、核酸分子の配列中に標的とする SNP
- 5 P 部位に対応する塩基が含まれていることを意味し、この塩基は核酸分子の内部に位置していても、5' 末端または 3' 末端に位置していてもよい。このような核酸分子は、SNP のタイピングにおいて、ハイブリダイゼーションプローブ、TaqMan プローブ等として用いることができる。さらに、本発明の核酸分子は SNP 部位の周囲の領域とは無関係な配列をさらに含有していてもよい。この
- 10 ような核酸分子は、SNP のタイピングにおいて、インバーダー法におけるプライマリープローブとして用いることができる。また、核酸分子が塩基に「隣接する」とは、核酸分子が、標的とする SNP 部位に対応する塩基を含まないが、SNP 部位に隣接する上流または下流の連続するヌクレオチド配列を含むことを意味する。配列番号 1 で規定される配列の 11 番目の塩基に「隣接する」配列の例
- 15 は、配列番号 1 で規定される配列の 1-10 番目の塩基を含む配列であり、別の例は 12-21 番目の塩基を含む配列である。このような核酸分子は、SNP のタイピングにおいて、インバーダー法におけるインバーダープローブまたは MALDI-TOF/MS 法およびプライマーエクステンション法におけるプライマーとして用いることができる。これらのプローブは、本発明の教示にしたがって、
- 20 CYP 2C8 遺伝子または BUB 1 b 遺伝子の配列を参照することにより設計することができる。

また好ましくは、本発明のキットに含有される試薬は、以下のプライマー核酸分子から選択される 1 またはそれ以上の核酸分子である：

- CYP 2C8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 11 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；
- 25 CYP 2C8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 11 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；
- CYP 2C8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 11 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；

CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

5 BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

10 BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

BUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対。

15 これらのプライマー対は、種々のタイピング法において標的遺伝子を増幅するために用いることができる。これらのプライマー対は、本発明の教示にしたがって、CYP2C8遺伝子またはBUB1b遺伝子の配列を参照することにより設計することができる。増幅のための好適なプライマー対の設計方法は当該技術分野においてよく知られている。

20

#### 発明の詳細な説明

本発明においては、パクリタキセル療法による副作用と関連する遺伝子多型を検索するため、まず薬剤代謝関連遺伝子ならびに薬理学的にパクリタキセルの作用機序に関連する遺伝子298個を選定した。次にこれら298個の遺伝子内に

25 存在するSNPsをJ SNPデータベース上で検索を行い、2,727個のSNPsを抽出した。パクリタキセルを投与した54名の乳癌患者の末梢血からDNAを抽出し、SNPsのタイピングを行ったところ、後述の実施例に示されるように、CYP2C8遺伝子内にマップされた5個のSNP (IMS-JST111898

(配列番号1)、IMS-JST105874 (配列番号2)、IMS-JST082397 (配列番



号 3)、IMS-JST071852 (配列番号 4)、IMS-JST071853 (配列番号 5))、  
ならびに BUB 1 b 遺伝子内にマップされた 5 個の SNP (IMS-JST074538  
(配列番号 6)、IMS-JST079837 (配列番号 7)、IMS-JST044164 (配列番  
号 8)、IMS-JST063023 (配列番号 9)、IMS-JST042569 (配列番号 1

5 0)) について、顆粒球減少症の発症との相関が見いだされた。

なお、上記の IMS-JST 番号は、J SNP データベース (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) におけるエントリー番号であり、NCBI の dbSNP データベースをはじめとする各種データベースから検索することができる。本明細書においては、本発明において見いだされたこれらの SNPs の位置をより明確に示す  
10 ために、ゲノム配列中の当該 SNP 部位およびその前後各 10 塩基を含む配列をそれぞれ配列番号 1-10 として示し、これらの配列番号を参照して SNPs を表している。後にシークエンスエラーや新たな多型が発見されることにより、これらの配列番号に示される塩基配列の一部が変動するかもしれないことは、当業者には明らかであろう。

15 CYP2C8 (チトクローム P450, ファミリー 2, サブファミリー C, ポリペプチド 8) は、種々の薬物の代謝に関与するチトクローム P450 であり、染色体位置 10q23.33 にマップされている。パクリタキセルの代謝は主に肝細胞において行われ、代謝物は胆汁中に排泄される。パクリタキセルの解毒化には CYP2C8 による加水分解能が重要な働きをしており、これによりパクリタキセルが解毒化された 6 $\alpha$ -ヒドロキシパクリタキセルに分解される (Rahman, A., et al. Selective biotransformation of taxol to 6 $\alpha$ -hydroxytaxol by human  
20 cytochrome P450 2C8. Cancer Res, 54: 5543-5546, 1994)。このため、CYP2C8 蛋白質がパクリタキセルの血中濃度の決定に重要な働きをしていることが考えられる。このことは CYP2C8 が副作用とも関連している可能性を示唆している。CYP2C8 遺伝子にはいくつかの cSNP があることが知られている。  
25 例えば、アミノ酸の置換を伴う 5 箇所の cSNP のうち一つ (416G->A) は、パクリタキセルの代謝速度がワイルドタイプに比べて遅くなることが知られている (Bahadur, N., et al. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 $\alpha$ -hydroxylase activity in human liver

microsomes. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1579-1589, 2002; Dai, D., et al.

Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*, 11: 597-607, 2001).

しかし、日本人を対象としたアレル頻度の解析研究において、これらの c S N P  
5 s の頻度は極めて低いことが知られている。実際、本発明において実施したタイ  
ピングにおいても 5 4 検体から 1196A>G の変異アレルが一つ見つかったのみで  
ある。これらのことから C Y P 2 C 8 遺伝子に存在する既知の c S N P s はパク  
リタキセルの顆粒球減少症にはほとんど関与していないことが示唆される。本発  
明により見いだされた S N P s は、未知のメカニズムで顆粒球減少症と関連して  
10 いるものと考えられる。

B U B 1 b 遺伝子は、出芽酵母において有糸分裂のチェックポイントに関連し  
ている B U B 遺伝子のホモログであり、染色体位置 15q15 にマップされている  
(Cahill, D. P., et al Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers.  
*Nature*, 392: 300-303, 1998; Hoyt, M. A., et al. *S. cerevisiae* genes required for  
15 cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 66: 507-517,  
1991.; Li, R. and Murray, A. W. Feedback control of mitosis in budding yeast.  
*Cell*, 66: 519-531, 1991)。パクリタキセルの抗腫瘍効果は微小管の重合を促進さ  
せることにより発揮され、微小管がパクリタキセルの標的分子である。これらの  
ことは、B U B 1 b 遺伝子とパクリタキセルの薬理作用が、機能的な面で関連が  
20 あることを示唆している。

本発明において、パクリタキセル療法による副作用との相関が見いだされた S  
N P s の位置および多型の情報を以下の表に示す。

表 2

IMS-JST111898  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST111898  
dbSNP ID(rs#) : 1557044  
dbSNP ID(ss#) : 4944611  
HGVbase ID : SNP000830254  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 11)  
5' Assay : AAAAAGAAAG GTCAAGGCAG GAGCCTCAGC  
TCAGGAGAAG AAACAAGGAG CAGAGCAAGG  
Observed : A/G  
3' Assay : CAACTGTTTC TCAAGGAATA AAATTATTGC TCTAAAGAGA  
GAAAGTGAAC TTATTTTATC

表 3

IMS-JST105874  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST105874  
dbSNP ID(rs#) : 3752988  
dbSNP ID(ss#) : 4939017  
HGVbase ID :  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 12)  
5' Assay : CAAATTCCCC ATGTGTCCAA AAAAAATCAG CATGGATGAA  
ATAAACACAT TACTTTTACC  
Observed : T/C  
3' Assay : TAAATATGAG TTGAGCATT A CAGGCTAGCT AAACAATGTC  
ATTCGCATG TGGTTATTCA

表 4

IMS-JST082397

## General Information

JSNP ID : IMS-JST082397

dbSNP ID(rs#) : 1891071

dbSNP ID(ss#) : 4923304

HGVbase ID :

Organism : Homo sapiens

Molecular type: Genomic

## Allele Sequence

Variation Type : SNP

Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 13)

5' Assay : TTGATGACAC AATT TAAAAT GACATCTTTG TACAATGGAG  
GAGGATGACA GAGATCAGTA

Observed : A/G

3' Assay : AAACAGTATG GCAGTAGCAA AATAAGTAAA GCACTGATGA  
AGTGTCTGGA TTTCAGCAAA

表 5

IMS-JST071852

## General Information

JSNP ID : IMS-JST071852

dbSNP ID(rs#) : 2275620

dbSNP ID(ss#) : 3211768

HGVbase ID : SNP001282389

Organism : Homo sapiens

Molecular type: Genomic

## Allele Sequence

Variation Type : SNP

Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 14)

5' Assay : CTCATCCCCAAGGTAAGCTT GTTCTCTTA CACTATATTT  
CTGTACTTCT GAAATTTCCA

Observed : T/A

3' Assay : AGTGCTGGTT TGGTTCCAAC CCTCTAACAA CACAAGATGA  
GAGAAGTGCAAAACTCATAC

表 6

IMS-JST071853  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST071853  
dbSNP ID(rs#) : 1934951  
dbSNP ID(ss#) : 3211769  
HGVbase ID : SNP001276002  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 15)  
5' Assay : TTTTGGGAAT TAGTTGGAAT TTACATGGCA CTCCTCTGG  
GGCTGGTAGAATTGCTATTT  
Observed : G/A  
3' Assay : TCCATGATCA AGAGCACAC TCTTAACACC CATGTGCTCC  
ACCCTCACA TACACCATCA

表 7

IMS-JST074538  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST074538  
dbSNP ID(rs#) : 2277559  
dbSNP ID(ss#) : 3214454  
HGVbase ID : SNP001383307  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 16)  
5' Assay : TTTGAAACTT GGC GGCTAGG GGTGTGGGCT  
TGAGGTGGCC GGT TTGT TAG GGAGTCGTGT  
Observed : A/G  
3' Assay : CGTGCCTTGG TCGCTTCTGT AGCTCCGAGG  
GCAGGTTGCG GAAGAAAGCC CAGGCGGTCT

表 8

IMS-JST079837  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST079837  
dbSNP ID(rs#) : 3214012  
dbSNP ID(ss#) : 4474916  
HGVBbase ID :  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 17)  
5' Assay : TAAATGTCTT CCGAAAGGTG ATTATTCATG GTCTTGGGTT  
GAATATAGTG GACTGACACA  
Observed : T/G  
3' Assay : AATTATTATT ATTATTATAT GCCTAAGCTT CTTTGTTAGC  
TGTTTTTCAA GTTTATGGCT

表 9

IMS-JST044164  
General Information  
JSNP ID : IMS-JST044164  
dbSNP ID(rs#) : 1801376  
dbSNP ID(ss#) : 3234079  
HGVBbase ID :  
Organism : Homo sapiens  
Molecular type: Genomic  
Allele Sequence  
Variation Type : SNP  
Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 18)  
5' Assay : CCCACCCTTA ATAATTCCCA CTTCAAATA TCCAAAACCC  
ACACTCACAT AACTGGCTGT  
Observed : C/T  
3' Assay : GTGCAGTCTC TTCCACATAT GGAGTGAAAC  
TGGGAAGCAC AGCGGGTACA GCTATCAGTG

表 1 0

IMS-JST063023  
 General Information  
 JSNP ID : IMS-JST063023  
 dbSNP ID(rs#) : 2305653  
 dbSNP ID(ss#) : 3252938  
 HGVbase ID : SNP001383945  
 Organism : Homo sapiens  
 Molecular type: Genomic  
 Allele Sequence  
 Variation Type : SNP  
 Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 19)  
 5' Assay : TCTTCAAGAC AACCCAGATAA ATTAATCAAT ATTTTGTGTT  
 GTTTGAAAGC AGGAAGGCAA  
 Observed : C/T  
 3' Assay : CTGTTTTTTT AATAACAAAA AGCTTCAAAC ATATAAAAGG  
 TCATTAAACA ATTTACCAAT

表 1 1

IMS-JST042569  
 General Information  
 JSNP ID : IMS-JST042569  
 dbSNP ID(rs#) : 2290551  
 dbSNP ID(ss#) : 3232484  
 HGVbase ID : SNP001383051  
 Organism : Homo sapiens  
 Molecular type: Genomic  
 Allele Sequence  
 Variation Type : SNP  
 Flanking Sequence Information (SEQ ID NO: 20)  
 5' Assay : AGGCCATGAAAGAAGCTGCA TAGCTGGTCT TTAAAAAAAAA  
 AAGGTACCTT GGGTACATCT  
 Observed : T/C  
 3' Assay : AGCTATGCCAACAACTCCCT CCAGTGGTTAATTTTGAAAA  
 TGCACCTGTAAGACAGAGCA

- 5 本発明の方法においては、パクリタキセルによる治療が計画されているか、あるいはパクリタキセルを投与されている被験者から末梢血液、他の体液、細胞、組織等を採取し、これらの試料から定法によりゲノムDNAを調製する。必要な場合には、タイピングすべき部位の配列を増幅する。遺伝子多型のタイピングは、

当該技術分野において知られるかまたは開発されつつある種々の方法のいずれかを用いて容易に行うことができる。タイピング方法の例としては、直接シーケンス法、インベーター法、TaqMan法、MALDI-TOF/MS法、プライマーエクステンション法およびハイブリダイゼーション法等が挙げられるが、

5 これらに限定されない。

直接シーケンス法を用いる場合には、SNP部位を含む領域のDNAをPCRにより増幅し、このPCR産物の配列を直接シーケンスすることにより、SNPを同定することができる。

10 インベーター法を用いる場合には、SNP部位から3'側に特異的な配列を含むインベータープローブと、テンプレートのSNP部位から5'側に特異的な配列および無関係なフラップ配列を含むプライマリープローブとを用意する。これらのプローブと、フラップと相補的な配列と自己相補的な配列を含み蛍光色素とクエンチャーとの両方で標識されているFRETプローブ、およびテンプレートの存在下でクリベースを作用させる。プライマリープローブがテンプレートとハイブリダイズすると、SNP部位にインベータープローブの3'末端が侵入し、この構造がクリベースにより切断されてフラップが遊離する。フラップはFRETプローブと結合して、クリベースにより蛍光色素部分が切断されて、蛍光が発生する。フラップ-FRETプローブを2組用意し、異なる蛍光色素で標識することにより、1回のアッセイで各ホモ接合体とヘテロ接合体とを区別することが

15

20 できる。

TaqMan法を用いる場合には、蛍光色素とクエンチャーにより標識したアレール特異的プローブを標的部位にハイブリダイズさせて、この部位を含む領域を増幅するよう設計したプライマーでPCR反応を行う。プライマーからの伸長反応が進むと同時に、TaqDNAポリメラーゼの5'エキソヌクレアーゼ活性により、ハイブリダイズしたプローブが切断される。蛍光色素がクエンチャーと離れると蛍光が生じ、これを検出することによりSNPを同定することができる。

25

MALDI-TOF/MS法を用いる場合には、SNP部位に隣接するプライマーを作成し、PCR増幅させたサンプルDNAを鋳型として、ddNTPを用いて1塩基分だけプライマー伸長を行う。伸長反応生成物をMALDI-TOF



／MSで質量分析することにより、付加したd d N T Pを識別する。

ハイブリダイゼーション法を用いる場合には、SNP部位を含む領域のDNAをPCRにより増幅し、SNP部位に特異的なプローブを用いてハイブリダイゼーションにより増幅産物を検出する。さらに、これらの方法に加えて、RFLP  
5 法、DNAチップ法、分子ビーコン法、ライゲーション法などの種々の方法が開発されており、本発明においてはこれらのいずれをも用いることができる。

本発明の方法にしたがえば、本発明において同定されたSNP部位の1またはそれ以上についてタイピングを行い、後述の実施例において示される統計データを参照して、パクリタキセル療法による副作用の発症のリスクを予測することが  
10 できる。本発明の方法は、好ましくはモンゴロイドに、特に好ましくは日本人に適用される。より好ましくは、本発明において同定されたCYP2C8遺伝子中のSNPと、BUB1b遺伝子中のSNPについてタイピングを行い、これらの結果を組み合わせることにより、パクリタキセル療法による副作用の発症のリスクを予測する。そのような組み合わせの例としては、

- 15 IMS-JST111898（配列番号1）とIMS-JST074538（配列番号6）、  
IMS-JST111898（配列番号1）とIMS-JST079837（配列番号7）、  
IMS-JST111898（配列番号1）とIMS-JST044164（配列番号8）、  
IMS-JST111898（配列番号1）とIMS-JST063023（配列番号9）、  
IMS-JST111898（配列番号1）とIMS-JST042569（配列番号10）、
- 20 IMS-JST105874（配列番号2）とIMS-JST074538（配列番号6）、  
IMS-JST105874（配列番号2）とIMS-JST079837（配列番号7）、  
IMS-JST105874（配列番号2）とIMS-JST044164（配列番号8）、  
IMS-JST105874（配列番号2）とIMS-JST063023（配列番号9）、  
IMS-JST105874（配列番号2）とIMS-JST042569（配列番号10）、
- 25 IMS-JST082397（配列番号3）とIMS-JST074538（配列番号6）、  
IMS-JST082397（配列番号3）とIMS-JST079837（配列番号7）、  
IMS-JST082397（配列番号3）とIMS-JST044164（配列番号8）、  
IMS-JST082397（配列番号3）とIMS-JST063023（配列番号9）、  
IMS-JST082397（配列番号3）とIMS-JST042569（配列番号10）、

- IMS-JST071852 (配列番号 4) と IMS-JST074538 (配列番号 6) 、  
IMS-JST071852 (配列番号 4) と IMS-JST079837 (配列番号 7) 、  
IMS-JST071852 (配列番号 4) と IMS-JST044164 (配列番号 8) 、  
IMS-JST071852 (配列番号 4) と IMS-JST063023 (配列番号 9) 、  
5 IMS-JST071852 (配列番号 4) と IMS-JST042569 (配列番号 10) 、  
IMS-JST071853 (配列番号 5) と IMS-JST074538 (配列番号 6) 、  
IMS-JST071853 (配列番号 5) と IMS-JST079837 (配列番号 7) 、  
IMS-JST071853 (配列番号 5) と IMS-JST044164 (配列番号 8) 、  
IMS-JST071853 (配列番号 5) と IMS-JST063023 (配列番号 9) 、  
10 IMS-JST071853 (配列番号 5) と IMS-JST042569 (配列番号 10) が挙げられる。

本発明はまた、上述のタイピング法において用いるための試薬を含む、パクリタキセル療法による副作用の発症のリスクを予測するためのキットを提供する。試薬の例はプローブおよびプライマーである。本発明において同定された SNP

15 部位を含む遺伝子の領域を増幅するために用いられるプライマーは、好ましくは 15-30 塩基の長さであり、標的 SNP 部位を挟みかつ PCR 反応により所望の長さの増幅産物が生成されるよう設計される。インベーター法において用いられるプライマリープローブは、標的 SNP 部位から 5' 側の標的領域に特異的な配列を含み、さらに無関係なフラップ配列を含む。また、インベーター法において

20 用いられるインベータープローブおよび MALDI-TOF/MS 法およびプライマーエクステンション法において用いられるプライマーは、標的 SNP 部位に対応する塩基を含まないが、SNP 部位に隣接する上流または下流の連続するヌクレオチド配列を含む。このようなプローブおよびプライマーの設計方法ならびに合成方法は当該技術分野においてよく知られている。

- 25 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2003-375369 号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

## 実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

### 5 臨床サンプル

5 4名の乳癌患者がパクリタキセルの術前化学療法の臨床試験に登録された。患者選択の条件について要約すると以下の通りである。1) 70歳以下で病理組織学的に確認されたステージII また IIIa の乳癌患者であること、2) 生理学的機能が適切であること(WBC > 4,000 mm<sup>3</sup>, 血小板カウント > 10,000 mm<sup>3</sup>, ヘモグロビンレベル > 10g/dl, 血清クレアチニン濃度 < 1.2 mg/dl, 血清総ビリルビンレベル < 1.5mg /dl, GOT/GPT < 60/70)。本治療の前に化学療法あるいは放射線療法が施行されていないことなどである。すなわち、パクリタキセルの術前化学療法の臨床試験が施行された54名は、臨床上また組織学的にもほぼ同一のステージであり、前症例とも化学療法の施行歴はなかった。患者は、一週間に一回、  
10 モグロビンレベル > 10g/dl, 血清クレアチニン濃度 < 1.2 mg/dl, 血清総ビリルビンレベル < 1.5mg /dl, GOT/GPT < 60/70)。本治療の前に化学療法あるいは放射線療法が施行されていないことなどである。すなわち、パクリタキセルの術前化学療法の臨床試験が施行された54名は、臨床上また組織学的にもほぼ同一のステージであり、前症例とも化学療法の施行歴はなかった。患者は、一週間に一回、  
15 80mg/m<sup>2</sup>のパクリタキセルを1時間かけて点滴投与された。この投与を12週間継続した。これらの患者に最も高頻度に観察された副作用は顆粒球減少症であり、24名の患者に認められた。

### 副作用の定義

20 副作用の有無を確認するために各患者について毎週、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、血小板数が測定された。治療中に認められた副作用は米国 National Cancer Institute の Common Toxicity Criteria(NCI-CTC)に基づいて評価されグレード分類が行われた(Trotti, A., et al. Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer  
25 treatment: impact on radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 47: 13-47, 2000 参照)。すべての臨床情報は SCTS21 システム (三井情報開発) を用いて匿名化され、以後の解析に用いられた。顆粒球減少症のグレードが NCI-CTC の分類にてグレード1~4までを示した患者を顆粒球減少症ありとし、グレード0の患者を顆粒球減少症なしとした。顆粒球減少症あり群となし群間で年齢、発症

年齢間に相関は認められなかった。

### SNP s のタイピング

5 パクリタキセルの副作用と関連する遺伝子多型を検索するため、まず薬剤代謝  
関連遺伝子ならびに薬理学的にパクリタキセルの作用機序に関連する遺伝子 29  
8個を選定した。次にこれら 298個の遺伝子内に存在する SNP s を J SNP  
データベース上で検索を行い、2,727個の SNP s を抽出した。

本研究に用いた 54 症例についてインバーダー法を用いて 298 遺伝子内にあ  
る 2,727カ所の SNP のタイピングを行った。54名の患者から末梢血 14ml  
10 を採取した。末梢血から DNA を抽出する方法については標準的な方法を用いた。  
インバーダー法によるタイピングを行う前に、標的とする SNP 部位の周辺約  
500bp を PCR 法にて増幅した。その際 10ng の DNA をテンプレートとして用  
い、また 48 個のプライマーセットを用いたマルチプレックス PCR を行うこと  
により 48カ所の DNA 断片を同時に増幅した。各 SNP 部位周辺を増幅するた  
15 めに用いたプライマーは J SNP データベースに記載されている配列に基づいて  
作製したものをを用いた。PCR の反応は以下の組成にて行った (6.7 mM MgCl<sub>2</sub>,  
67 mM TrisHCl, 16.6 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 10mM 2-メルカプトエタノール, 6.7μM  
EDTA, 1.5mM dNTPs, 10% DMSO, 1 pmol の各プライマー, および 0.05U の  
Ex-Taq)。PCR の反応は最初のディネーチャー反応は 94℃にて 2 分間行い、  
20 次に 94℃ 15 秒、60℃ 15 秒、72℃ 2 分の 3 ステップを 35 回繰り返した。  
Multimek96 反応ロボットを用いて PCR 産物を滅菌蒸留水にて希釈した後、  
TANGO 分注機を用いてインバーダー反应用カードに分注した。次に Cartesian  
分注機を用いてインバーダー反応試薬をインバーダー用反応カードに分注した。  
インバーダー反応試薬には、アレル特異的オリゴヌクレオチド、Cleavase VII、  
25 そして FAM あるいは Redmond Red にてラベルされた FRET カセットが含ま  
れている。これらの試薬は Third Wave 社より購入した。蛍光シグナルは  
TECAN Ultra にて検出し、ジェノタイプは FAM と Redmond Red の信号強度  
を 2 次元チャートに展開したものをを用いて決定した。

ジェノタイピングを行った 2,727 SNP s のうち 2,123 SNP s につい

ては80%以上の症例においてタイピングの決定を行うことができた。ジェノタイプの正確性について検討を行うため、ランダムに選んだ3 SNPsのタイピングデータをRFLP法にて決定したジェノタイプと比較した所、調べた約1,000超のジェノタイプの全てで両タイピング法での結果が一致した。このことからタイピングの正確性は非常に高いものであることが示唆された。また、各SNPについて Hardy-Weinberg 平衡状態であるかどうかについてカイ2乗検定を用いて行ったところ、調べた全てのSNPsが Hardy-Weinberg の平衡状態にあることが示唆された。

#### 10 副作用と関連するSNPsの検索および相関解析

まず最初に、各遺伝子毎にハプロタイプブロック構造の構築を行った。同一遺伝子内にマップされたSNPについて、任意の2つのSNP間の連鎖不平衡係数 $|D'|$ をすべての組み合わせについて推定し、これをSNPの位置順に並べたマトリックスを作成した。もし2つのSNP間の $|D'|$ が0.9以上であれば、2遺伝子間はハプロタイプブロックを形成しているものと推定した。その結果、タイピングを行った298遺伝子は419個のハプロタイプブロックに分割されることが分かった。

次に副作用と関連するSNPを同定するために、2段階のスクリーニングを行った。第一段階では、副作用がある群とない群間でのジェノタイプの分布について、2 x 3分割表を用いた独立性の検定を行った。第一段階のスクリーニングにより顆粒球減少症と相関を認める2箇所のハプロタイプブロックが見いだされた。これらのハプロタイプブロックには各々CYP2C8遺伝子内にマップされた5個のSNP、ならびにBUB1b遺伝子内にマップされた5個のSNPが含まれていた。p値の最低値はCYP2C8遺伝子を含むハプロタイプブロックでは0.0065、BUB1b遺伝子を含むハプロタイプブロックでは0.010であった。

第一段階で同一ハプロタイプブロック内あるいは同一遺伝子内にある全てのSNP p値が0.05以下であるものを第2段階の解析に用いた。第2段階では、優性遺伝モデルあるいは劣性遺伝モデルを想定した2 x 2分割表を作成し、独立性の検定を Fisher's exact test を用いて行った。

表 1 2. CYP2C8 遺伝子と顆粒球減少症との相関

距離 (bp)	SNP	ジェ ノタ イプ	顆粒球減少症		P 値	オッズ比 (95% c.i.)
			(+)(n=24)	(-)(n=30)		
0	IMS- JST111898	G/G	9	2	0.00774	8.13
		A/G & A/A	15	27		(1.46- 45.5)
6,506	IMS- JST105874	T/T	13	3	0.00351	7.63
		C/T & C/C	11	27		(1.72- 33.3)
26,018	IMS- JST082397	G/G	10	2	0.00271	10.0
		A/G & A/A	14	28		(1.93- 52.6)
28,791	IMS- JST071852	T/T	10	2	0.00202	10.7
		A/T & A/A	13	28		(2.09- 55.6)
32,841	IMS- JST071853	G/G	11	3	0.00351	7.63
		A/G & A/A	13	27		(1.72- 33.3)

表 13. BUB1b 遺伝子と顆粒球減少症との相関

距離 (bp)	SNP	ジェ ノ タ イ プ	顆粒球減少症		P 値	オッズ比 (95% c.i.)
			(+)(n=24)	(-)(n=30)		
0	IMS- JST074538	A/A	14	7	0.00627	5.11
		A/G & G/G	9	23		(1.41- 18.5)
3,822	IMS- JST079837	T/T	14	7	0.00627	5.11
		G/T & G/G	9	23		(1.41- 18.5)
24,524	IMS- JST044164	C/C	14	10	0.0187	3.85
		C/T & T/T	8	22		(1.93- 52.6)
41,191	IMS- JST063023	C/C	15	9	0.0111	4.36
		C/T & T/T	8	21		(1.22- 15.6)
56,293	IMS- JST042569	T/T	15	9	0.0169	3.89
		C/T & C/C	9	23		(1.10- 13.6)

第 2 段階の解析では 2 つの遺伝子にマップされた SNP のいずれも劣性遺伝形式を想定した場合より高い相関を認めた。最も高い相関を認めた SNP は CYP

- 5 2C8 遺伝子にマップされた SNP では IMS-JST071852( $p = 0.0020$ , オッズ比 10.7)であり、BUB1b 遺伝子にマップされた SNP では IMS-JST074538( $p = 0.0062$ , オッズ比 5.11)であった。CYP2C8 遺伝子内に存在する 3 箇所の既知の cSNP が、本研究で使用した SNPs と関連があるかどうかを調べるため、
- 10 結果一症例に 1196A>G 部位のヘテロ接合体を認めたのみで、他の症例では 3 箇

所のc SNP全てでワイルドタイプであった。このことからCYP2C8遺伝子内に存在する3箇所のc SNPsの頻度は非常に低いものと推定された。また、BUB1b遺伝子内にマップされる一個のSNP(IMS-JST044164)における多型はアミノ酸置換(Arg->Gln)を伴うc SNPである。本研究ではワイルドタイプである Arg を持つアレルをホモに持つ割合が顆粒球減少症を示す患者で多いことが示された。

#### ジェノタイプの組み合わせによる副作用出現確率の推定

CYP2C8遺伝子上の一個のSNPとBUB1b遺伝子上の一個のSNPのジェノタイプの組み合わせの各々について副作用出現の確率を計算した。計算にはロジスティック回帰モデルを用いた。その際4個の変数を用い、CYP2C8遺伝子上のSNPのアレルタイプ2種類と、BUB1b遺伝子上のSNPのアレルタイプ2種類を各々割り当てた。likelihood ratio test を用い最も適切なSNPの組み合わせを検索し、CYP2C8遺伝子上のIMS-JST071852とBUB1b遺伝子上のIMS-JST074538の組み合わせを選択した( $p < 0.000532$ )。この2つのSNPsのジェノタイプ別の副作用出現確率を表13に示す。アレル頻度はJ SNPデータベースより得られた各々のSNPのアレル頻度より推定した。

表14. 各ジェノタイプによる顆粒球減少症発症の確率

		IMS-JST074538 (BUB1B)		
		A/A	A/G	G/G
IMS-JST071852 (CYP2C8)	T/T	0.95 (12%)*	0.61 (14%)	0.82 (4%)
	A/T	0.56 (19%)	0.10 (23%)	0.25 (7%)
	A/A	0.65 (8%)	0.14 (14%)	0.32 (3%)

\* 括弧内の数字は日本人集団におけるアレル頻度予測を示す

本発明により、2つの遺伝子の2個のSNPを用いれば顆粒球減少症発症の可能性を確実に予測することができることが示された。CYP2C8遺伝子上の



- IMS-JST071852 と BUB 1 b 遺伝子上の IMS-JST074538 のジェノタイプの組み合わせが T/T と A/A、あるいは T/T と G/G の組み合わせであれば顆粒球減少症を発症する確立が非常に高いと考えられる。J SNP データベースにおいて公開されているアレル頻度をもとにすれば、これら 2 つのジェノタイプの組み合わせの日本人における頻度はそれぞれ 0.12 と 0.04 である。他方、顆粒球減少症を発症する確率が低いと考えられるジェノタイプの組み合わせは、A/T と A/G、あるいは A/A と A/G の組み合わせであり、これらの組み合わせの日本人における頻度はそれぞれ 0.23 と 0.14 である。以上の結果を組み合わせれば、日本人の約半数についてはパクリタキセル治療における顆粒球減少症の発症の有無を予測できることがわかる。

## 請求の範囲

1. 被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法であって、前記被験者から単離された遺伝子について、CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型、およびBUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選択される1またはそれ以上の遺伝子多型を同定する工程を含む方法。
2. 被験者から単離された遺伝子が、以下の(a)～(e)：
- (a) CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがG/Gである；
- (b) CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tである；
- (c) CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがG/Gである；
- (d) CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tである；
- (e) CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがG/Gである；
- のうち1またはそれ以上である場合に、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予

測する、請求項1記載の方法。

3. 被験者から単離された遺伝子が、以下の(f)～(j)：

(f) CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/GまたはA/Aである；

5 (g) CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがC/TまたはC/Cである；

(h) CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/GまたはA/Aである；

10 (i) CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/TまたはA/Aである；

(j) CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/GまたはA/Aである；

のうち1またはそれ以上である場合に、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測する、請求項1記載の方法。

15 4. 被験者から単離された遺伝子が、以下の(A)～(E)：

(A) BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがA/Aである；

(B) BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tである；

20 (C) BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがC/Cである；

(D) BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがC/Cである；

25 (E) BUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基におけるジェノタイプがT/Tである；

のうち1またはそれ以上である場合に、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測する、請求項1記載の方法。

5. 被験者から単離された遺伝子が、以下の(F)～(J)：

(F) BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基にお

けるジェノタイプがA/GまたはG/Gである；

(G) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプがG/TまたはG/Gである；

5 (H) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 8 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプがC/TまたはT/Tである；

(I) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプがC/TまたはT/Tである；

(J) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプがC/TまたはC/Cである；

10 のうち 1 またはそれ以上である場合に、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測する、請求項 1 記載の方法。

6. 被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法であって、前記被験者から単離された遺伝子について、(1) CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺  
15 伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 5 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選  
20 択される 1 またはそれ以上の遺伝子多型を同定する工程、および (2) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 8 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1  
25 番目の塩基における遺伝子多型、および BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選択される 1 またはそれ以上の遺伝子多型を同定する工程、を含む方法。

7. 被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法であって、前記被験者から単離された遺伝子について、CYP 2 C

8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基および BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型を同定することを含む請求項 6 記載の方法。

5 8. CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプが T/T であり、かつ BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプが A/A または G/G であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが高いと予測する、請求項 7 記載の方法。

9. CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプが A/T または A/A であり、かつ BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基におけるジェノタイプが A/G であるときに、顆粒球減少症の発症のリスクが低いと予測する、請求項 7 記載の方法。

10 10. 被験者におけるパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測するための診断用キットであって、前記被験者から単離された遺伝子について、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 5 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 8 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型、および BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10  
20 で規定される配列の 1 1 番目の塩基における遺伝子多型からなる群より選択される 1 またはそれ以上の遺伝子多型を同定するための試薬を含有することを特徴とするキット。

11. 前記試薬が、

CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含むか

またはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれ

5   これに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

10  CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

15  BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

20  BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

25  BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；および

BUB1b遺伝子中の配列番号10で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；

からなる群より選択される1またはそれ以上の核酸分子である、請求項10記載の診断用キット。

12. 前記試薬が、

(1) CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；および、CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子からなる群より選択される1またはそれ以上の核酸分子；および

(2) BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；BUB1b遺伝子中の配列番号9で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；およびBUB1b遺伝子中の配列番号

10で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子からなる群より選択される1またはそれ以上の核酸分子；を含む、請求項10記載の診断用キット。

5 13. 前記試薬が、

CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；および

10 BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基を含むかまたはこれに隣接する少なくとも10個の連続するヌクレオチド配列、またはこれに相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子；を含む、請求項10記載の診断用キット。

14. 前記試薬が、

15 CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

20 CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

25 BUB1b遺伝子中の配列番号6で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

BUB1b遺伝子中の配列番号7で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；

BUB1b遺伝子中の配列番号8で規定される配列の11番目の塩基を含む領域に対応するDNAを増幅するよう設計されたPCRプライマー対；



BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；

BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対。

- 5 からなる群より選択される 1 またはそれ以上のプライマー対である、請求項 10 記載の診断用キット。

15. 前記試薬が、

- (1) CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 1 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 2 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 3 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；および、 CYP 2 C 8 遺伝子中の配列番号 5 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；からなる群より選択される 1 またはそれ以上のプライマー対、および

- (2) BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 7 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 8 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 9 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対； BUB 1 b 遺伝子中の配列番号 10 で規定される配列の 1 1 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；からなる群より選択される 1 またはそれ以上のプライマー対；

を含む、請求項 10 記載の診断用キット。

16. 前記試薬が、

CYP2C8 遺伝子中の配列番号 4 で規定される配列の 11 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対；および

- 5 BUB1b 遺伝子中の配列番号 6 で規定される配列の 11 番目の塩基を含む領域に対応する DNA を増幅するよう設計された PCR プライマー対を含む、請求項 10 記載の診断用キット。

## SEQUENCE LISTING

<110> Cancer Institute

<120> Method and Kit for Prediction of Adverse Effect of Paclitaxel

<130> PGK-9001WO

<150> JP 2003-375369

<151> 2003-11-05

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 1

cagagcaagg rcaactgttt c

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 2

tacitttacc ytaaataatga g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 3

gagatcagta raaacagtat g

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 4

gaaatticca wagtgtgtt t

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 5

attgctattt riccatgatc a

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 6

ggagtcgtgt rcgtgccttg g

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 7

gactgacaca kaattattat t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 8

aactggctgt ygtgcagtct c

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> homo sapiens

&lt;400&gt; 9

aggaaggcaa yctgtttttt t

21

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 10

gggtacatct yagctatgcc a

21

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 11

aaaaagaaag gtcaaggcag gagcctcagc tcaggagaag aaacaaggag cagagcaagg

60

rcaactgttt ctcaaggaat aaaattattg ctctaaagag agaaagtga cttatittat

120

c

121

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 12

caaattcccc atgtgtccaa aaaaaatcag catggatgaa ataaacacat tacttttacc

60

ytaaataatga gttgagcatt acaggctagc taaacaatgt catttcgcat gtggttattc

120

a

121

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 13

ttgatgacac aattttaa at gacatctttg tacaatggag gaggatgaca gagatcagta

60

raaacagtat ggcagtagca aaataagtaa agcactgatg aagtgtctgg atttcagcaa 120

a 121

<210> 14

<211> 121

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 14

ctcatcccca aggtaagcct gtttctctta cactatatct ctgtacttct gaaatttcca 60

wagtgtgggt ttggttccaa cctcttaaca acacaagatg agagaagtgc aaaactcata 120

c 121

<210> 15

<211> 121

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 15

tttttggaaat tagttggaat ttacatggca cctcctctgg ggctggtaga attgctatct 60

rtccatgatc aagagcacca cctttaacac ccatgtgctc caccctcaca atacaccatc 120

a 121

<210> 16

<211> 121

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 16

tttgaaactt ggcggctagg ggtgtgggct tgagggtggcc ggtttgtag ggagtcgtgt 60

rcgtgccttg gtcgttctg tagctccgag ggcagggtgc ggaagaaagc ccaggcggtc 120

t 121

<210> 17

<211> 121

<212> DNA

<213> homo sapiens

&lt;400&gt; 17

taaatgctt ccgaaaggig attattcatg gctttgggtt gaatatagtg gactgacaca 60

kaattattat tattattata tgcctaagct tctttgttag ctgttttca agtttatggc 120

t 121

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 18

cccaccctta ataattccca ctccaaaata tccaaaaacc acactcacat aactggctgt 60

ygtgcagtct ctccacata tggagtgaag ctgggaagca cagcgggtac agctatcagt 120

g 121

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 19

tcttcaagac aaccagataa attaatcaat attttgtgtt gtttgaaagc aggaaggcaa 60

yctgtttttt taataacaaa aagcttcaaa catataaaag gtcattaaac aatttaccaa 120

t 121

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; homo sapiens

&lt;400&gt; 20

aggccatgaa agaagctgca tagctggctt ttaaaaaaaaa aaggtaccit gggtagatct 60

yagctatgcc aacaactccc tccagtgggt aattttgaaa atgcacctgt aagacagagc 120

a 121

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP2004/016805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2003-93068 A (Director General of National Institute of Health Sciences), 02 April, 2003 (02.04.03), (Family: none)	1-3, 6, 10-11, 14 12, 15
Y A	Bahadur N. et al., CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes, Biochem Pharmacol, 2002, Vol.64, No.11, pages 1579 to 1589	1-3, 6, 10-11, 14 12, 15
Y A	SOYAMA A. et al., Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism, Biol Pharm Bull, 2001, Vol.24, No.12, pages 1427 to 1430	1-3, 6, 10-11, 14 12, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
17 January, 2005 (17.01.05)

Date of mailing of the international search report  
01 February, 2005 (01.02.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/016805

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JSNP DATABASE ( <a href="http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/">http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/</a> ) JSNP ID: IMS-JST111898, 11 October, 2001 (11.10.01)	1-3, 6, 10-11, 14 12, 15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016805

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
The parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:1 in claims 1 to 3, 6, 10 to 12 and 14 to 15.

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/016805

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The technical feature common to claims 1 to 16 resides in a method for risk estimation of the onset of granulocytopenia caused by paclitaxel treatment by identifying polymorphisms at polymorphism sites in CYP2C8 gene or BUB1b gene. As reported in Biol. Pharm. Bull., 2001, Vol.24, No.12, pp.1427-1430, Biochemical Pharmacology, 2002, Vol.64, pp.1579-1589, etc., it has been already known that the sensitivity of a patient to paclitaxel treatment can be estimated by identifying polymorphisms at polymorphism sites in CYP2C8 gene and, therefore, the above common technical feature cannot be considered as a special technical feature.

Accordingly, it does not appear that there is a technical relationship involving special technical features among the inventions as set forth in claims 1 to 16 and these inventions cannot be considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Such being the case, the inventions as set forth in claims of the present application have the following six groups of inventions respectively concerning:

- (1) the parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:1 in claims 1 to 3, 6, 10 to 12 and 14 to 15;
- (2) the parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:2 in claims 1 to 3, 6, 10 to 12 and 14 to 15;
- (3) the parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:3 in claims 1 to 3, 6, 10 to 12 and 14 to 15;
- (4) the parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:4 in claims 1 to 3 and 6 to 16;
- (5) the parts relating to the identification of a gene polymorphism at the 11th base in the sequence of CYP2C8 gene which is specified by SEQ ID NO:5 in claims 1 to 3, 6, 10 to 12 and 14 to 15; and
- (6) the parts relating to the identification of a gene polymorphism in BUB1b gene in claims 1 and 6 to 16 and the inventions according to claims 4 to 5.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/00 C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	JP 2003-93068 A (国立医薬品食品衛生研究所長) 2003. 04. 02 (ファミリーなし)	1-3, 6, 10-11, 14/12, 15
Y/A	Bahadur N. et al., CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes, Biochem Pharmacol, 2002, Vol. 64, No. 11, pp. 1579-1589	1-3, 6, 10-11, 14/12, 15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 01. 2005

国際調査報告の発送日

01. 2. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

飯室 里美

4 B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . . . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	Soyama A. et al., Non-synonymous single nucleotide alterations found in the CYP2C8 gene result in reduced in vitro paclitaxel metabolism, Biol Pharm Bull, 2001, Vol.24, No. 12, pp.1427-1430	1-3, 6, 10-11, 14/12, 15
Y/A	JSNP DATABASE ( <a href="http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/">http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/</a> ) JSNP ID: IMS-JST111898 (2001.10.11)	1-3, 6, 10-11, 14/12, 15

請求の範囲1-16に共通する技術的特徴は、CYP2C8遺伝子またはBUB1b遺伝子の多型部位における多型を同定することによりパクリタキセル療法による顆粒球減少症の発症のリスクを予測する方法に係るものであるという点であるが、「Biol. Pharm. Bull., 2001, Vol. 24, No. 12, pp. 1427-1430」、「Biochemical Pharmacology, 2002, Vol. 64, pp. 1579-1589」等に記載されるように、CYP2C8遺伝子の多型部位における多型を同定することによりパクリタキセル療法に対する患者の感受性を予測できることは、すでに知られているので、上記共通の技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとは言えない。

そうすると、請求の範囲1-16に記載された発明は、特別な技術的特徴を含む技術的な関係にあるものとはいえず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

したがって、本出願の請求の範囲に記載された発明には、

(1) 請求の範囲1-3、6、10-12、14-15のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

(2) 請求の範囲1-3、6、10-12、14-15のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号2で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

(3) 請求の範囲1-3、6、10-12、14-15のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号3で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

(4) 請求の範囲1-3、6-16のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号4で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

(5) 請求の範囲1-3、6、10-12、14-15のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号5で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

(6) 請求の範囲1、6-16のうち、BUB1b遺伝子中の遺伝子多型を同定することに関する部分及び請求の範囲4-5に係る発明の、6発明が包含されている。

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
(特別ページ) 参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-3、6、10-12、14-15のうち、CYP2C8遺伝子中の配列番号1で規定される配列の11番目の塩基における遺伝子多型を同定することに関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**